

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
—  
**INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**  
—  
PARIS  
—

①① N° de publication : **2 974 580**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)  
②① N° d'enregistrement national : **11 53642**  
*C 12 M 3/00 (2013.01), C 12 M 3/02*  
⑤① Int Cl<sup>8</sup> :

⑫ **BREVET D'INVENTION** **B1**

⑤④ **RECIPIENT POUR LA CULTURE IN VITRO DE MATERIEL VEGETAL EN CONDITIONS STÉRILES, PAR IMMERSION TEMPORAIRE.**

②② **Date de dépôt** : 28.04.11.

③③ **Priorité** :

⑥⑥ **Références à d'autres documents nationaux apparentés** :

⑦① **Demandeur(s)** : *CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT - C.I.R.A.D. Etablissement public — FR.*

⑦② **Inventeur(s)** : ETIENNE HERVE, GEORGET FREDERIC et BERTRAND BENOIT.

④③ **Date de mise à la disposition du public de la demande** : 02.11.12 Bulletin 12/44.

④⑤ **Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention** : 24.01.14 Bulletin 14/04.

⑤⑥ **Liste des documents cités dans le rapport de recherche** :

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑦③ **Titulaire(s)** : CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT - C.I.R.A.D. Etablissement public.

⑦④ **Mandataire(s)** : CABINET HARLE ET PHELIP Société anonyme.

FR 2 974 580 - B1



L'invention concerne la culture de matériel végétal, et particulièrement un récipient pour la culture *in vitro* de matériel végétal, par immersion temporaire, en conditions stériles.

5 La multiplication des végétaux par culture *in vitro*, en conditions stériles, est une pratique courante dans le domaine de l'horticulture et de l'agriculture. Cette pratique offre de nombreux avantages, mais génère un coût de main d'œuvre relativement élevé qui est lié à la fréquence des manipulations nécessaires et à leur haute technicité.

10 Les techniques de culture *in vitro* en milieu nutritif liquide permettent de limiter cette charge. Ce type de culture présente de nombreux avantages, malheureusement contrebalancés par des inconvénients importants, essentiellement liés à des problèmes d'asphyxie de la culture et/ou de forces de friction lorsque le matériel végétal est en permanence immergé.

15 Pour pallier à ces inconvénients, il a été développé une technique dite d'« immersion temporaire », qui consiste, comme son nom le suggère, à immerger de façon temporaire le matériel végétal en culture (explants, cellules, tissus, etc.) dans un milieu nutritif. Compte-tenu de phénomènes de flottaison ou de phénomènes de croissance, cette immersion dans le milieu nutritif peut être partielle ou totale.

20 Pendant la phase de repos, qui constitue la plus longue période, le matériel cultivé est émergé et sans mouvement ; mais un film de milieu nutritif, retenu sur le matériel végétal par des tensions de surface à l'issue de la phase précédente d'immersion, maintient ce matériel humidifié.

25 Ce procédé permet ainsi de bénéficier des avantages de la culture *in vitro* en milieu liquide, tout en évitant les problèmes d'asphyxie et de friction. Il permet aussi d'obtenir une qualité de développement de la culture qui est particulièrement intéressante en comparaison de celle obtenue par d'autres procédés de culture *in vitro*.

Un récipient adapté pour cette technique de culture par immersion temporaire est par exemple décrit dans le document FR-2 730 743, commercialisé à ce jour sous la dénomination « RITA ».

Le récipient RITA comprend deux chambres superposées, à savoir :  
5 une chambre supérieure destinée à recevoir le matériel végétal, et une chambre inférieure destinée à contenir le milieu nutritif sous une forme liquide.

Les dimensions de la chambre supérieure confèrent à cette dernière une forme allongée verticalement, avec une hauteur et un diamètre de l'ordre de  
10 60 mm et 108 mm, respectivement ; le rapport surface horizontal (en m<sup>2</sup>)/ hauteur (en m) est ainsi de l'ordre de 0,15.

Ce récipient comprend un corps unitaire formant une pièce extérieure fermée par un couvercle, et un panier pour la séparation des deux chambres. Une entrée située sur le couvercle permet l'alimentation d'une surpression  
15 conduite dans la chambre inférieure par un tube débouchant dans une cloche.

La surpression provoque une remontée d'une partie du milieu nutritif depuis la chambre inférieure jusqu'à la chambre supérieure, assurant une immersion et un brassage du matériel végétal ; l'arrêt de la surpression  
20 permet le retour, par gravité, du milieu nutritif dans la chambre inférieure.

L'immersion du matériel végétal est ainsi réalisée par déplacement du milieu nutritif, poussé par une surpression, et non par le déplacement mécanique du panier support. Cette absence de mouvements mécaniques accroît la fiabilité du dispositif.

25 Ce récipient permet une culture *in vitro* en conditions stériles, limitant le risque d'infection, tout en assurant une bonne fiabilité de la culture durant un nombre important de cycles d'immersion.

Un tel récipient est également intéressant sur le plan de l'entretien, du démontage et du lavage ; il est notamment facilement stérilisable entre deux  
30 cycles d'utilisation.

Cependant, en pratique, les inventeurs ont observé que, dans la chambre supérieure, le matériel végétal est présent sous une forme relativement compacte, ce qui est défavorable au brassage et à une bonne exposition à la lumière.

5 Cette biomasse a en plus tendance à se développer d'une manière hétérogène sur la hauteur de la chambre supérieure, entraînant un phénomène de stratification.

En particulier, la partie supérieure de la biomasse, plus exposée à la lumière et peu contrainte physiquement, se développe plus vite que la partie centrale  
10 de cette biomasse, comprimée physiquement et gênée pour son accès à la lumière.

Pour ces raisons, le matériel végétal évolue différemment suivant sa position dans la biomasse, ce qui crée une stratification avec un gradient de développement croissant du bas vers le haut.

15 Or, les inventeurs sont parvenus à déterminer que, de manière surprenante, ces phénomènes de compactage et de stratification sont liés à la forme et au volume inadaptés de la chambre supérieure du récipient de l'état de la technique.

Pour remédier à ces inconvénients, les inventeurs ont développé un  
20 récipient dont la chambre supérieure est significativement plus large que la chambre supérieure équipant le récipient de l'art antérieur décrit dans le document FR-2 760 743 précité, tout en conservant une hauteur similaire.

Dans ce contexte, la demanderesse propose une nouvelle structure pour un récipient de culture *in vitro* de matériel végétal, par immersion  
25 temporaire, fonctionnant d'une manière similaire à celle décrite dans le document FR-2 730 743.

Le récipient correspondant comprend deux chambres superposées, à savoir - une chambre supérieure, destinée à contenir lesdits tissus végétaux à cultiver, et - une chambre inférieure, destinée à contenir un liquide nutritif,  
30 lesquelles chambres sont chacune délimitées par une face latérale, par une face supérieure et par une face inférieure, lequel récipient comporte encore

des moyens pour le transfert temporaire d'au moins une partie (avantageusement de la quasi-totalité ou de la totalité) dudit liquide nutritif depuis ladite chambre inférieure jusqu'à ladite chambre supérieure.

Et conformément à la présente invention, la face inférieure de la chambre supérieure, destinée à porter le matériel végétal, présente une surface horizontale comprise entre 0,02 et 0,07 m<sup>2</sup> ; en outre, la face latérale de la chambre supérieure présente une hauteur comprise entre 40 et 130 mm.

Le rapport surface horizontale (en m<sup>2</sup>)/ hauteur (en m) de la chambre supérieure de récipient selon l'invention est ainsi compris entre, environ, 0,50 et 1,75.

Par « surface horizontale » de la face inférieure de la chambre supérieure, on entend la surface délimitée par le contour de cette face inférieure, cela sur un plan horizontal passant par ce contour.

Cette surface horizontale correspond encore à l'encombrement horizontal de cette face inférieure de la chambre supérieure.

Cette surface horizontale est, de préférence, comprise entre 0,03 et 0,04 m<sup>2</sup>, et de préférence encore de l'ordre de 0,037 m<sup>2</sup>.

Un tel récipient permet un étalement optimal de la biomasse dans la chambre supérieure, avec moins de concurrence pour l'accès à la lumière.

Ce récipient permet également un développement homogène et synchrone du matériel végétal, supprimant ainsi les phénomènes habituels de stratification.

Selon une forme de réalisation préférée, la chambre supérieure présente une forme générale cylindrique, dont :

- la face inférieure présente un rayon compris entre 75 et 150 mm, de préférence de l'ordre de 100 à 120 mm, et de préférence encore de l'ordre de 110 mm (c'est-à-dire un diamètre compris entre 150 mm et 300 mm, de préférence de l'ordre de 200 à 240 mm, et de préférence encore de l'ordre de 220 mm), et
- la face latérale présente une hauteur comprise entre 50 et 90 mm, de préférence encore de l'ordre de 60 à 70 mm.

Dans le cas d'une telle face inférieure de contour circulaire, on peut encore utiliser le rapport diamètre / hauteur de la chambre supérieure pour définir l'élargissement de la chambre supérieure du récipient.

En l'occurrence, ce rapport est avantageusement bien supérieur à 1, de  
5 préférence compris entre 1,6 (150/90) et 6 (300/50), de préférence encore entre 2,2 (200/90) et 4,8 (240/50), et encore entre 3,14 (220/70) et 3,66 (220/60).

Selon une caractéristique de réalisation, la surface de la face  
inférieure de la chambre supérieure est supérieure à la surface de la face  
10 inférieure de la chambre inférieure et à la surface de la face supérieure de la chambre inférieure.

Selon une forme de réalisation avantageuse, le récipient comporte une enveloppe extérieure délimitée par une bordure inférieure à laquelle se raccorde un élément de fond et par une bordure supérieure délimitant une  
15 ouverture obturée hermétiquement par un couvercle amovible ; l'enveloppe extérieure comporte deux parties, l'une inférieure et l'autre supérieure, séparées par une paroi intérieure intercalaire, lesdites parties inférieure et supérieure formant, respectivement, les faces latérales de la chambre inférieure et de la chambre supérieure, et ladite paroi intérieure intercalaire  
20 formant la face supérieure de la chambre inférieure et au moins une partie, de préférence la quasi-totalité ou encore la totalité, de la face inférieure de la chambre supérieure.

Dans ce cas, la paroi intérieure intercalaire appartient avantageusement à une pièce intérieure rapportée, coopérant de manière  
25 hermétique avec l'enveloppe extérieure associée.

Cette pièce intérieure rapportée comporte avantageusement une paroi latérale s'élevant depuis le contour de la paroi intérieure intercalaire pour former ensemble une structure en forme de panier, ladite paroi latérale épousant l'enveloppe extérieure sur au moins une partie, de préférence la  
30 quasi-totalité ou encore la totalité, de la hauteur de sa partie supérieure.

Les parties supérieure et inférieure de l'enveloppe extérieure sont avantageusement reliées par une partie formant épaulement ; et une bande périphérique de la paroi intérieure intercalaire de la pièce intermédiaire rapportée repose sur ladite partie épaulement par le biais de moyens d'étanchéité.

Selon encore une caractéristique de réalisation avantageuse, les moyens pour le transfert temporaire du liquide nutritif comportent - au moins un passage pour le raccordement hydrique des chambres supérieure et inférieure, et - des moyens pour l'introduction d'un gaz dans ladite chambre inférieure, de sorte à générer, d'une part, un cheminement d'une partie au moins (de préférence la quasi-totalité ou encore la totalité) du liquide nutritif depuis ladite chambre inférieure jusqu'à ladite chambre supérieure par une surpression en gaz dans ladite chambre inférieure et, d'autre part, un retour par gravité dudit liquide nutritif dans ladite chambre inférieure lors de l'arrêt de ladite surpression en gaz.

Dans ce cas, le passage de raccordement entre les chambres consiste avantageusement en un conduit s'étendant sur la hauteur de la chambre inférieure, lequel conduit est muni d'au moins un orifice inférieur débouchant à proximité de la face inférieure de ladite chambre inférieure et d'au moins un orifice supérieur débouchant au niveau de la face inférieure de la chambre supérieure.

Une partie au moins de la face inférieure de la chambre supérieure est alors avantageusement constituée par un organe de filtration obturant une réservation dans laquelle débouche le ou les orifices supérieurs du conduit de raccordement ; cet organe de filtration comporte avantageusement une pluralité d'orifices, pour la répartition du liquide nutritif, et le cas échéant du gaz de surpression, cheminant en direction de la chambre supérieure ; et la paroi intérieure intercalaire comporte avantageusement une partie centrale concave, ouverte du côté de la chambre supérieure et au niveau de laquelle est rapporté l'organe de filtration pour former la réservation.

Ce conduit de raccordement se termine avantageusement par au moins deux orifices supérieurs, régulièrement répartis sur la périphérie dudit conduit.

Encore selon cette caractéristique avantageuse, les moyens d'introduction de gaz dans la chambre inférieure consistent en un conduit débouchant au travers de sa face latérale et ménagé du côté de sa face supérieure.

Selon une autre caractéristique de réalisation avantageuse, le récipient comporte (i) un couvercle muni d'au moins deux ailettes d'accrochage rentrantes, réparties sur sa périphérie, et (ii) une ouverture supérieure munie sur sa périphérie de portions de collerette.

Ce couvercle rapporté sur ladite ouverture est manœuvrable en rotation entre - une position verrouillée, dans laquelle chacune desdites ailettes d'accrochage se positionne en-dessous de l'une desdites portions de collerette, et - une position déverrouillée, dans laquelle lesdites ailettes d'accrochage sont dissociées desdites collerettes.

La présente invention est encore illustrée, sans aucunement être limitée, par la description suivante d'une forme de réalisation particulière, en relation avec les dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 est une vue générale et en perspective du récipient selon l'invention ;
- la figure 2 représente schématiquement le récipient de la figure 1, selon un plan de coupe vertical ;
- la figure 3 représente le récipient de la figure 1, d'une manière éclatée ;
- la figure 4 montre de manière agrandie le détail IV de la figure 2, correspondant à l'extrémité supérieure du conduit de raccordement hydrique située entre les chambres supérieure et inférieure ;
- la figure 5 illustre de manière agrandie le détail V de la figure 2, correspondant aux moyens d'étanchéité ménagés entre l'enveloppe extérieure et le panier rapporté ;



- la figure 6 représente de manière agrandie le détail VI de la figure 2, correspondant aux moyens d'étanchéité ménagés entre l'enveloppe extérieure et le couvercle amovible ;

5 - les figures 7 et 8 illustrent le fonctionnement du récipient selon l'invention, avec une phase de repos dans laquelle le liquide nutritif se situe au niveau de la chambre inférieure (figure 7) et une phase d'immersion temporaire dans laquelle le liquide nutritif est déplacé dans la chambre supérieure pour submerger / noyer le matériel végétal (figure 8).

10 Le récipient 1, représenté de manière générale sur les figures 1 à 3, constitue un dispositif qui est adapté pour la culture *in vitro* de matériel végétal par immersion temporaire, en conditions stériles.

Ce récipient 1 consiste en un dispositif unitaire, ici en forme générale de fût.

15 Tel qu'illustré par la figure 2, ce récipient 1 comprend deux chambres 3 et 4 superposées, ici chacune en forme générale de cylindre circulaire droit, à savoir :

- une chambre supérieure 3, destinée à contenir le matériel végétal M à cultiver (figures 7 et 8), et

20 - une chambre inférieure 4, destinée à contenir un liquide nutritif L (figures 7 et 8).

Ces chambres 3 et 4 sont chacune délimitées par une face latérale annulaire 3a et 4a, par une face supérieure en forme générale de disque 3b et 4b, et par une face inférieure également en forme générale de disque 3c et 4c.

25 Ce récipient 1 comporte encore des moyens 5 pour le transfert temporaire d'au moins une partie (de préférence la quasi-totalité ou encore la totalité) du liquide nutritif depuis la chambre inférieure 4 jusqu'à la chambre supérieure 3, qui seront décrits par la suite en relation avec les figures 2 et 3.

30 Tel que développé ci-après en relation avec les figures 7 et 8, les moyens 5 pour le transfert temporaire du liquide nutritif L, sont structurés pour générer, d'une part, un cheminement de ce liquide nutritif L depuis la

chambre inférieure 4 jusqu'à la chambre supérieure 3 par une surpression en gaz dans ladite chambre inférieure 4 et, d'autre part, un retour par gravité dudit liquide nutritif dans ladite chambre inférieure 4 lors de l'arrêt de cette surpression en gaz.

5            Selon l'invention, la chambre supérieure 3 est dimensionnée pour limiter les phénomènes de stratification et de compactage du matériel végétal cultivé M, et aussi pour optimiser l'accès à la lumière de ce matériel.

          A cet effet, la face inférieure circulaire 3c de la chambre supérieure 3, destinée à porter les tissus végétaux, présente ici un contour circulaire 3c1  
10 dont le rayon R est de l'ordre de 110 mm.

De manière générale, ce rayon R est avantageusement compris entre 75 et 150 mm, et de préférence entre 100 et 120 mm.

          Ce contour 3c1 s'étend dans un plan horizontal P, perpendiculaire à l'axe général 1' du récipient 1, sur lequel il délimite une surface ou une aire  
15 horizontale S (figure 2) de l'ordre de 0,037 m<sup>2</sup>.

De manière générale, cette surface horizontale S est comprise entre 0,02 m<sup>2</sup> et 0,07 m<sup>2</sup>.

          La face latérale 3a présente quant à elle une hauteur H de l'ordre de 60 à 70 mm.

20 De manière générale, cette hauteur H est avantageusement comprise entre 40 et 130 mm, de préférence encore entre 50 et 90 mm.

Cette chambre supérieure 3 présente ainsi une forme générale cylindrique relativement aplatie.

          La chambre inférieure 4 présente quant à elle un rayon de l'ordre de  
25 78 à 87 mm, de préférence de l'ordre de 82 mm (correspondant au rayon de ses faces inférieure 4c et supérieure 4b), et une hauteur de l'ordre de 75 mm.

          La surface de la face inférieure 3c de la chambre supérieure 3 est ainsi supérieure à la surface de la face inférieure 4c de la chambre inférieure  
30 4 et à la surface de la face supérieure 4b de la chambre inférieure 4.

Pour constituer ces chambres 3 et 4, le récipient 1 se compose d'un assemblage de différentes pièces qui sont décrites en détails ci-dessous en relation avec les figures 2 et 3.

Le récipient 1 comporte, tout d'abord, une pièce extérieure monobloc 6, comportant une enveloppe extérieure latérale 7 qui est délimitée par :

- une bordure inférieure 8, à laquelle se raccorde un élément de fond 9 en forme de disque, et
- une bordure supérieure 10, délimitant une ouverture 11 destinée à être obturée hermétiquement par un couvercle amovible 12.

L'enveloppe extérieure 7 comporte ici trois parties annulaires réparties sur sa hauteur, à savoir une partie supérieure tubulaire 7a, une partie inférieure tubulaire 7b et une partie de jonction 7c constituant un épaulement annulaire en forme de couronne.

Ces différentes parties 7a, 7b et 7c s'étendent toutes coaxialement à un même axe vertical 7', formant l'axe de l'enveloppe extérieure 7.

Les parties supérieure 7a et inférieure 7b de l'enveloppe extérieure 7 présentent chacune un diamètre constant, ou au moins approximativement constant, sur leurs hauteurs respectives.

La partie supérieure 7a de l'enveloppe extérieure 7 présente de plus un diamètre supérieur par rapport au diamètre de la partie inférieure 7b ; les parties supérieure 7a et inférieure 7b de l'enveloppe extérieure 7 sont ainsi reliées, au niveau de leurs bordures en regard, par la partie formant épaulement 7c.

Les parties supérieure 7a et inférieure 7b de l'enveloppe extérieure 7 présentent en plus une hauteur identique, ou au moins approximativement identique, par rapport à la chambre supérieur 3 et à la chambre inférieur 4, respectivement.

En particulier, la partie supérieure 7a de l'enveloppe extérieure 7 présente avantageusement une hauteur comprise entre 50 et 90 mm, de préférence encore de l'ordre de 60 à 70 mm.

La partie inférieure 7b de l'enveloppe extérieure 7 et l'élément de fond 9 forment, respectivement, la face latérale 4a et la face inférieure 4c de la chambre inférieure 4.

5 Cette partie inférieure 7b de l'enveloppe 7 est munie d'un conduit latéral 15, pour l'introduction de gaz (par exemple de l'air) directement dans la chambre inférieure 4.

Un filtre à air hydrophobe F1, représenté très schématiquement sur la figure 1, est avantageusement fixé à ce conduit latéral 15 afin d'assurer la stérilité à l'intérieur du récipient 1.

10 Le conduit latéral 15 débouche au travers de la face latérale 4a de la chambre inférieure 4, et il est ménagé du côté de sa face supérieure 4b. L'axe longitudinal 15' de ce conduit latéral 15 est orienté selon une pente ascendante vers la périphérie, pour limiter le risque d'écoulement du liquide nutritif L au travers de ce conduit latéral 15 vers l'extérieur et ainsi éviter que le filtre associé F1 ne soit mouillé.

La partie formant épaulement 7c sert d'appui à une pièce intérieure rapportée 16, en forme de panier, qui est destinée à séparer les deux chambres 3 et 4 du récipient 1 et qui est destinée à former au moins une partie des faces de la chambre supérieure 3.

20 Cette pièce intérieure rapportée 16 comporte :

- une paroi de fond 16a en forme de disque, destinée à séparer les deux chambres 3 et 4 du récipient 1, et
- une paroi latérale tubulaire 16b, s'élevant depuis le contour de cette paroi de fond 16a.

25 La paroi latérale tubulaire 16b double intérieurement la partie supérieure 7a de l'enveloppe périphérique 7, pour former ensemble la face latérale 3a de la chambre supérieure 3.

30 Cette paroi latérale tubulaire 16b épouse l'enveloppe extérieure 7 sur la hauteur de sa partie supérieure 7a ; le diamètre de la surface extérieure de la paroi latérale 16b correspond ainsi, au jeu près, au diamètre de la surface intérieure de la partie supérieure 7a de l'enveloppe extérieure 7.

La paroi de fond 16a constitue une paroi intérieure intercalaire qui forme la face supérieure 4b de la chambre inférieure 4 et une partie de la face inférieure 3c de la chambre supérieure 3.

Une bande périphérique 16a1 de cette paroi de fond 16a repose sur la  
5 partie épaulement 7c de l'enveloppe extérieure 7, par le biais de moyens d'étanchéité 17 (figure 5).

Ces moyens d'étanchéité 17 consistent par exemple en un joint torique ou carré, réalisé en un matériau du type silicone.

Cette paroi de fond 16a présente une forme de disque, très  
10 légèrement tronconique, de manière à définir une pente descendante de la périphérie vers le centre.

Cette forme est utile pour assurer une collecte optimale du liquide nutritif L par gravité, à la fin de la phase d'immersion temporaire décrite par la suite.

Cette paroi de fond 16a comporte encore une partie centrale concave  
15 16a2, ouverte du côté de la chambre supérieure 3 et munie d'un orifice central traversant 16a3, pour recevoir une partie des moyens 5 pour le transfert du liquide nutritif entre les chambres 3 et 4.

Les moyens de transfert 5 comportent un organe de filtration 18, en forme de disque, qui est rapporté au niveau de cette partie centrale concave  
20 16a2, de manière à délimiter ensemble une réservation 19 pour le cheminement des fluides (liquide nutritif et gaz).

L'organe de filtration 18 constitue la partie centrale de la face inférieure 3c de la chambre supérieure 3.

Cet organe de filtration 18 consiste en une sorte de tamis comportant  
25 une toile 18a collée sur une pièce d'armature plastique 18b.

La pièce d'armature plastique 18b comporte des bras radiaux 18b1 dans chacun desquels sont ménagés des orifices 18b2 (ici trois orifices distant d'un centimètre l'un de l'autre), pour la répartition du liquide nutritif L, et le cas échéant du gaz de surpression, cheminant en direction de la  
30 chambre supérieure 3 (figures 2 et 3).

Ces moyens de transfert 5 comportent encore :

- une pièce centrale rapportée 20 comportant un tronçon inférieur 20a constituant un conduit de raccordement, assurant la liaison hydrique entre les deux chambres 3 et 4, et
- le conduit latéral 15 précité, pour l'introduction du gaz directement dans la

La pièce centrale 20 est rapportée au travers de l'orifice central 16a3 de la paroi de fond 16a du panier rapporté 16. Elle comporte un axe longitudinal 20' qui s'étend coaxialement par rapport l'axe vertical 7' de l'enveloppe extérieure 7.

Son conduit de raccordement 20a permet une remontée immédiate et totale du milieu nutritif L.

Pour cela, ce conduit de raccordement 20a s'étend sur toute la hauteur de la chambre inférieure 4.

Les extrémités de ce conduit de raccordement 20a sont munies d'orifices, à savoir :

- un orifice axial inférieur 20a1, débouchant à proximité de la face inférieure 4c de la chambre inférieure 4 (ou autrement dit la face supérieure de l'élément de fond 9), et
- deux orifices supérieurs latéraux 20a2, débouchant au sein de la

Les orifices supérieurs 20a2 du conduit de raccordement 20 sont diamétralement opposés ; ils s'étendent selon un axe radial 20a2', perpendiculaire à l'axe longitudinal 20' de cette pièce centrale 20 (figures 2 et 4).

Cette dernière caractéristique structurelle, en combinaison avec la pluralité d'orifices 18b2 de l'organe de filtration 18, permet notamment une répartition optimale du liquide nutritif L lors de sa remontée depuis la chambre inférieure 4 jusqu'à la chambre supérieure 3 et participe à l'amélioration du brassage du matériel végétal M.

Pour être complet, cette pièce centrale 20 comporte un prolongement axial 20b, poursuivant le conduit de raccordement 20a du côté des orifices supérieurs 20b.

5 Ce prolongement axial 20b est destiné à venir s'étendre sur la hauteur de la chambre supérieure 3 et à être poussé axialement vers l'élément de fond 9 par le couvercle 12 rapporté.

Pour rapporter le couvercle 12, la bordure supérieure 10 de l'enveloppe extérieure 7 est munie, sur sa périphérie, de quatre portions de collerette 10a définissant entre elles quatre ouvertures périphériques 10b (figure 3).

Pour son assemblage, le couvercle 12 est muni quant à lui de quatre ailettes d'accrochage rentrantes 12a, régulièrement réparties sur sa périphérie, destinées à venir chacune se loger (i) par une translation verticale, au travers de l'une des ouvertures périphériques 10b puis (ii) par un mouvement de rotation horaire, en-dessous de l'une des portions de collerette 10a (figures 2 et 6).

L'étanchéité du couvercle 12 assemblé sur l'enveloppe extérieure 7 est assurée par des structures annulaires complémentaires du genre nervure / rainure 21 ménagés sur les surfaces en appui de ce couvercle 12 et de la bordure supérieure 10 de l'enveloppe périphérique 7, en combinaison avec un joint d'étanchéité 22 (figure 6).

Ce couvercle 12 est encore équipé d'organes saillants 12b, pour la manœuvre manuelle en rotation sur la bordure supérieure 10 de l'enveloppe extérieure 7 (figures 2 et 3).

25 Ces organes saillants 12b forment également ensemble une surface de réception, sur laquelle peut être posé l'élément de fond 9 d'un récipient 1 superposé à des fins de stockage.

Un évent 12c, situé sur le couvercle 12, permet le passage du gaz entre l'intérieur et l'extérieur du récipient 1 dans un sens comme dans l'autre. Cet évent 12c est avantageusement raccordé à un filtre stérilisant hydrophobe F2, représenté très schématiquement sur la figure 1.

Cet évenement 12c permet ainsi, lors de la remontée du liquide nutritif, dans un premier temps l'évacuation du gaz contenu dans la chambre supérieure 3, poussé par le liquide nutritif, puis dans un second temps, d'évacuer la surpression continuant d'être alimentée.

5 Le couvercle 12 rapporté sur l'ouverture 11 est manœuvrable par rotation sur un secteur angulaire (ici d'un huitième de tour), selon deux sens inverses pour obtenir deux positions de fin de course :

- une position verrouillée (figures 1 et 2), dans laquelle chacune des ailettes d'accrochage 12a se positionne en-dessous de l'une des portions de  
10 collerette 10a, assurant ainsi quatre zones de serrage, et
- une position déverrouillée (figure 3), dans laquelle les ailettes d'accrochage 12a sont dissociées des collerettes 10a et viennent se positionner au travers des ouvertures périphériques 10b.

Dans la position verrouillée, le couvercle 12 vient exercer une force  
15 d'appui dirigée vers l'élément de fond 9 sur, d'une part, le prolongement axial 20b de la pièce centrale 20 (figure 2) et, d'autre part, la bordure supérieure libre 16b1 de la paroi latérale tubulaire 16b du panier intérieur 16 (figure 6). Le couvercle 12 constitue ici la face supérieure 3b de la chambre supérieure 3 du récipient 1.

20 La pièce extérieure 6, le panier intérieur 16, la pièce centrale 20 et le couvercle 12, constitutifs du récipient 1, sont avantageusement réalisés chacun dans un matériau plastique transparent autoclavable, par exemple en polycarbonate à usage clinique.

La transparence de ce matériau va permettre d'optimiser la luminosité  
25 apportée à la matière végétale cultivée.

De plus, ces différentes pièces 6, 16, 20 et 12 sont assemblées par simple emboîtement de formes complémentaires, sans moyens de liaison supplémentaires, ce qui facilite, d'une part, les opérations de renouvellement de milieu nutritif entre deux sub-cultures, et d'autre part, les opérations de  
30 montage et de démontage lors des opérations de nettoyage, mais aussi de stérilisation intervenant entre deux opérations de culture.



Le fonctionnement de ce récipient 1 est développé ci-dessous en relation avec les figures 7 et 8.

Tout d'abord, les différentes pièces 6, 16, 18, 20 et 12 constitutives du récipient 1 sont convenablement stérilisées.

5 Le matériel végétal à cultiver M est déposé sur la paroi de fond 16a du panier intérieur 16 qui est ensuite introduit dans la pièce extérieure 6 de sorte à reposer sur la partie de jonction 7c de son enveloppe externe 7.

Ce matériel végétal M consiste par exemple en des tissus végétaux cultivés in vitro, tels que des micro-tiges et des microboutures, du cal ou des  
10 embryons somatiques.

Le positionnement du couvercle 12 sur l'enveloppe externe 7 permet ensuite de fermer hermétiquement la pièce extérieure 6.

Ce couvercle 12 vient en plus exercer une poussée sur la bordure supérieure libre 16b1 de la paroi latérale 16b du panier 16, ce qui provoque  
15 l'écrasement des moyens d'étanchéité 17 de la partie de jonction 7c de l'enveloppe externe 7 par la paroi de fond 16a du panier intérieur 16, définissant ainsi les deux chambres 3 et 4 du récipient 1 (figure 7).

Comme évoqué précédemment, le couvercle 12 exerce également un appui sur l'extrémité supérieure attenante du prolongement axial 20b de la pièce  
20 centrale 20.

S'il a été préalablement stérilisé, le milieu nutritif L, sous forme liquide, est rapporté dans la chambre inférieure 4, par exemple au travers du conduit latéral 15 (de manière alternative, il peut être rapporté dans le récipient 1 avant sa stérilisation, pour leur stérilisation concomitante).

25 Ce milieu nutritif consiste par exemple en un milieu contenant les sels minéraux de Murashige et Skoog (1962) ou des formules dérivées de cette formulation, du sucre, des vitamines et des hormones végétales, de façon à assurer la multiplication et/ou la croissance du matériel végétal.

Dans la phase de repos (figure 7), ce milieu nutritif L se situe ainsi  
30 dans la chambre inférieure 4.

En phase active (figure 8), une surpression est appliquée dans la chambre inférieure 4, par l'introduction d'un gaz (par exemple de l'air) au travers du conduit latéral 15. Ce gaz est ici stérilisé lors du passage au travers du filtre hydrophobe F1 fixé à ce conduit latéral 15.

5 Cette surpression pousse le milieu nutritif L, provoquant ainsi sa remontée au travers du conduit de raccordement 20a puis au travers de l'organe de filtration 18, depuis la chambre inférieure 4 jusqu'à la chambre supérieure 3.

Lors de ce cheminement, le liquide nutritif L se répartit efficacement au travers des orifices supérieurs débouchants 20a2 du conduit de  
10 raccordement 20, puis de l'organe de filtration 18, assurant un brassage efficace de matériel végétal M.

Le maintien de l'alimentation de la surpression permet de maintenir le milieu nutritif L dans la chambre supérieure 3 du récipient 1, pour une  
15 immersion efficace du matériel végétal M.

Avantageusement, la surpression est appliquée durant une période supérieure à celle strictement nécessaire à la remontée du liquide nutritif L. La surpression peut, par exemple, être appliquée pendant une durée de une à deux minutes, toutes les deux ou quatre heures.

20 Cela provoque un bullage dans ce liquide nutritif L situé dans la chambre supérieure 3, améliorant son brassage et l'immersion du matériel végétal M. Ce maintien de la surpression provoque également un renouvellement de l'atmosphère contenue à l'intérieur du récipient 1. Cette aération est particulièrement intéressante car elle permet d'éviter l'effet néfaste d'une  
25 accumulation de gaz à l'intérieur du récipient 1 (notamment d'éthylène et de gaz carbonique).

Ce phénomène de bullage est ici optimisé par la structure particulière des orifices supérieurs débouchants 20a2 du conduit de raccordement 20a, associés à l'organe de filtration 18, et à la forme étalée de la chambre  
30 supérieure 3.

Le bullage énergétique ainsi obtenu participe un brassage efficace de la biomasse, qui est propice à un développement homogène et synchrone du matériel végétal M.

De façon préférentielle, la surpression est obtenue par l'introduction  
5 d'air comprimé. Ce dernier est fourni par une pompe délivrant de l'air comprimé exempt d'huile. Afin de protéger l'environnement interne stérile du récipient 1, l'entrée d'air est protégée par le filtre stérilisant hydrophobe F1.

L'arrêt de l'alimentation de la surpression entraîne le retour, par gravité, du milieu nutritif L depuis la chambre supérieure 3 jusqu'à la  
10 chambre inférieure 4.

Le liquide nutritif L subit alors un cheminement inverse, en passant successivement au travers de l'organe de filtration 18, de la cavité 19 et du conduit de raccordement 20a.

Ce retour provoque une entrée d'air au travers de l'évent 12c du couvercle  
15 12 ; afin de protéger l'environnement interne stérile du récipient 1, cette entrée d'air 12c est protégée par le filtre stérilisant hydrophobe F2.

La programmation des cycles d'immersion, et le fonctionnement de l'ensemble du récipient 1, de façon autonome, peuvent être réalisés de façon simple à l'aide d'un programmeur ou d'une prise électrique programmable.  
20 Une telle prise permet de contrôler le fonctionnement de la pompe, et donc le rythme des immersions et leur durée.

Pour récupérer la matière végétale M, il suffit à l'opérateur d'ouvrir le récipient 1, par une manœuvre appropriée du couvercle 12.

Le couvercle 12 dissocié, l'opérateur peut accéder à la chambre supérieure 3  
25 au travers de l'ouverture supérieure 11 de la pièce extérieure 6, et éventuellement extraire la pièce intérieure 16 en forme de panier.

Lorsqu'un cycle de culture est terminé, les différentes pièces 6, 12, 16, 18, 20, constitutives du récipient 1, peuvent être aisément séparées pour leur nettoyage et leur stérilisation en vue d'un cycle ultérieur de culture.

30 Le récipient 1 selon l'invention est adapté pour être manipulé et transporté par un opérateur. Il est en plus adapté pour être stocké sur des

étagères, superposés les uns au-dessus des autres ; il peut également être introduit dans différents dispositifs de laboratoire (autoclave, hotte à flux laminaire, etc.).

Ce récipient 1 offre les avantages suivants :

- 5 - il permet un étalement important du matériel végétal, pour améliorer l'accès à la lumière, et donc la capacité photosynthétique des plantules et leur comportement lors des délicates étapes d'acclimatation ;
- il augmente le brassage du matériel végétal lors des immersions temporaires, pour améliorer la synchronisation du développement des
- 10 plantes et donc leur homogénéité ; ceci permet de réduire considérablement le travail de manipulation lié à la sélection et au tri du matériel végétal ;
- il est très simple de fonctionnement, robuste, facile à transporter et avec un nombre de pièces réduit pour en faciliter l'utilisation au niveau industriel et réduire les coûts de production ;
- 15 - il facilite les opérations de repiquage du matériel végétal et le changement du milieu nutritif, du fait de son aspect monobloc, léger et facilement manipulable (ouverture facilitée du couvercle et transfert aisé de la biomasse grâce au panier intérieur).

20 Ce récipient est de plus parfaitement adapté aux différents matériels végétaux (cultures cellulaires, organes, plantules).

Il trouve une application notamment dans les domaines suivants :

- multiplication des espèces végétales par micropropagation,
- multiplication des espèces végétales par embryogenèse somatique,
- multiplication de « hairy roots » pour la production de métabolites
- 25 secondaires ou des études de génomique fonctionnelle, et
- multiplication de cellules végétales pour la production de métabolites secondaires ou pour l'amplification de matériel embryogène.

- REVENDICATIONS -

1.- Récipient pour la culture *in vitro* de matériel végétal en conditions stériles, par immersion temporaire, lequel récipient (1) comprend deux chambres (3, 4) superposées, à savoir - une chambre supérieure (3),  
5 destinée à contenir ledit matériel végétal (M) à cultiver, et - une chambre inférieure (4), destinée à contenir un liquide nutritif (L), lesquelles chambres (3, 4) sont chacune délimitées par une face latérale (3a, 4a), par une face supérieure (3b, 4b) et par une face inférieure (3c, 4c), lequel récipient (1) comporte encore des moyens (5) pour le transfert temporaire d'au moins une  
10 partie dudit liquide nutritif (L) depuis ladite chambre inférieure (4) jusqu'à ladite chambre supérieure (3),  
caractérisé en ce que ladite face inférieure (3c) de la chambre supérieure (3), destinée à porter ledit matériel végétal (M), présente une surface horizontale (S) comprise entre 0,02 et 0,07 m<sup>2</sup>, et en ce que ladite face latérale (3a) de la  
15 chambre supérieure (3) présente une hauteur (H) comprise entre 40 et 130 mm.

2.- Récipient selon la revendication 1, dans lequel la chambre supérieure (3) présente une forme générale cylindrique, dont la face inférieure (3c) présente un rayon (R) compris entre 75 et 150 mm, et dont la  
20 face latérale (3a) présente une hauteur (H) comprise entre 50 et 90 mm.

3.- Récipient selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, dans lequel ledit récipient (1) comporte une enveloppe extérieure (7) délimitée par une bordure inférieure (8) à laquelle se raccorde un élément de fond (9) et par une bordure supérieure (10) délimitant une ouverture (11) obturée  
25 hermétiquement par un couvercle amovible (12), laquelle enveloppe extérieure (7) comporte deux parties, l'une inférieure (7b) et l'autre supérieure (7a), séparées par une paroi intérieure intercalaire (16a), lesdites parties inférieure (7b) et supérieure (7a) formant, respectivement, les faces latérales (3b, 3a) de la chambre inférieure (4) et de la chambre supérieure  
30 (3), et ladite paroi intérieure intercalaire (16a) formant la face supérieure (4b)

de la chambre inférieure (4) et au moins une partie de la face inférieure (3c) de la chambre supérieure (3).

4.- Récipient selon la revendication 3, dans lequel la paroi intérieure intercalaire (16a) appartient à une pièce intérieure rapportée (16), coopérant  
5 de manière hermétique avec l'enveloppe extérieure (7) associée.

5.- Récipient selon la revendication 4, dans lequel la pièce intérieure rapportée (16) comporte une paroi latérale (16b) s'élevant depuis le contour de la paroi intérieure intercalaire (16a) pour former ensemble une structure  
10 (16) en forme de panier, ladite paroi latérale (16b) épousant l'enveloppe extérieure (7) sur au moins une partie de la hauteur de sa partie supérieure (7a).

6.- Récipient selon l'une quelconque des revendications 4 ou 5, dans lequel les parties supérieure (7a) et inférieure (7b) de l'enveloppe extérieure (7) sont reliées par une partie de jonction (7c) formant épaulement, et dans  
15 lequel une bande périphérique (16a1) de la paroi intérieure intercalaire (16a) de la pièce intermédiaire rapportée (16) repose sur ladite partie épaulement (7c) par le biais de moyens d'étanchéité (17).

7.- Récipient selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel les moyens (5) pour le transfert temporaire du liquide nutritif (L)  
20 comportent - au moins un passage (20a) pour le raccordement hydrique des chambres supérieure (3) et inférieure (4), et - des moyens (15) pour l'introduction d'un gaz dans ladite chambre inférieure (4), de sorte à générer, d'une part, un cheminement du liquide nutritif (L) depuis ladite chambre inférieure (4) jusqu'à ladite chambre supérieure (3) par une surpression en  
25 gaz dans ladite chambre inférieure (4) et, d'autre part, un retour par gravité dudit liquide nutritif (L) dans ladite chambre inférieure (4) lors de l'arrêt de ladite surpression en gaz.

8.- Récipient selon la revendication 7, dans lequel le passage (20a) de raccordement entre les chambres (3, 4) consiste en un conduit (20a)  
30 s'étendant sur la hauteur de la chambre inférieure (4), lequel conduit (20a) est muni d'au moins un orifice inférieur (20a1) débouchant à proximité de la

face inférieure (4c) de ladite chambre inférieure (4) et d'au moins un orifice supérieure (20a2) débouchant au niveau de la face inférieure (3c) de la chambre supérieure (3).

5 9.- Récipient selon la revendication 8, dans lequel une partie au moins de la face inférieure (3c) de la chambre supérieure (3) est constituée par un organe de filtration (18) obturant une réservation (19) dans laquelle débouche le ou les orifices supérieurs (20a2) du conduit de raccordement (20a).

10 10.- Récipient selon la revendication 9, dans lequel l'organe de filtration (18) comporte une pluralité d'orifices (18b2), pour la répartition du liquide nutritif (L), et le cas échéant du gaz de surpression, cheminant en direction de la chambre supérieure (3).

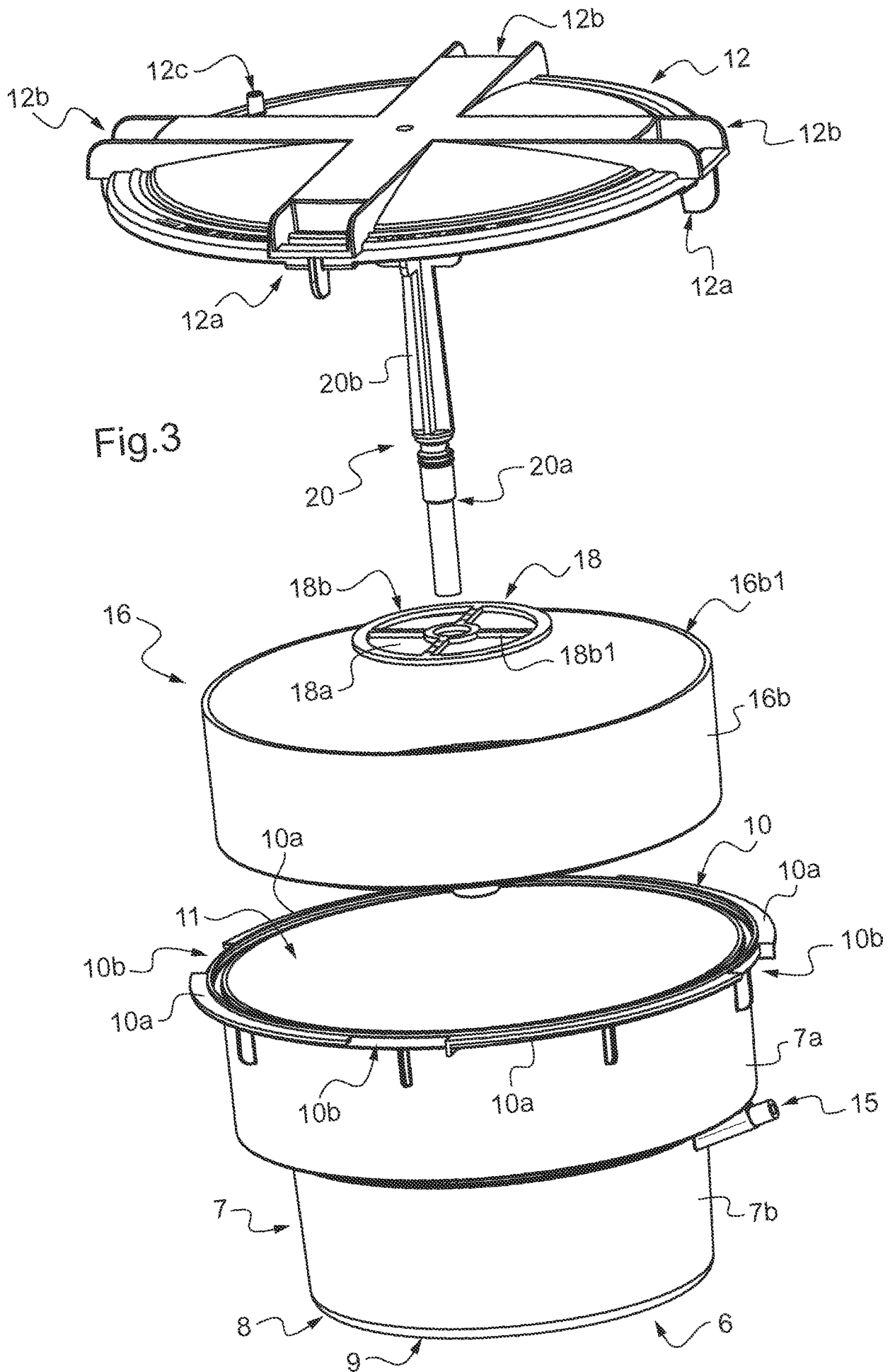
15 11.- Récipient selon l'une quelconque des revendications 9 ou 10, prise en combinaison avec l'une quelconque des revendications 3 à 6, dans lequel la paroi intérieure intercalaire (16a) comporte une partie centrale concave (16a2), ouverte du côté de la chambre supérieure (3) et au niveau de laquelle est rapporté l'organe de filtration (18) pour former la réservation (19).

20 12.- Récipient selon l'une quelconque des revendications 7 à 11, dans lequel les moyens (15) d'introduction de gaz dans la chambre inférieure (4) consistent en un conduit latéral (15) débouchant au travers de sa face latérale (4a) et ménagé du côté de sa face supérieure (4b)





2/4



3/4

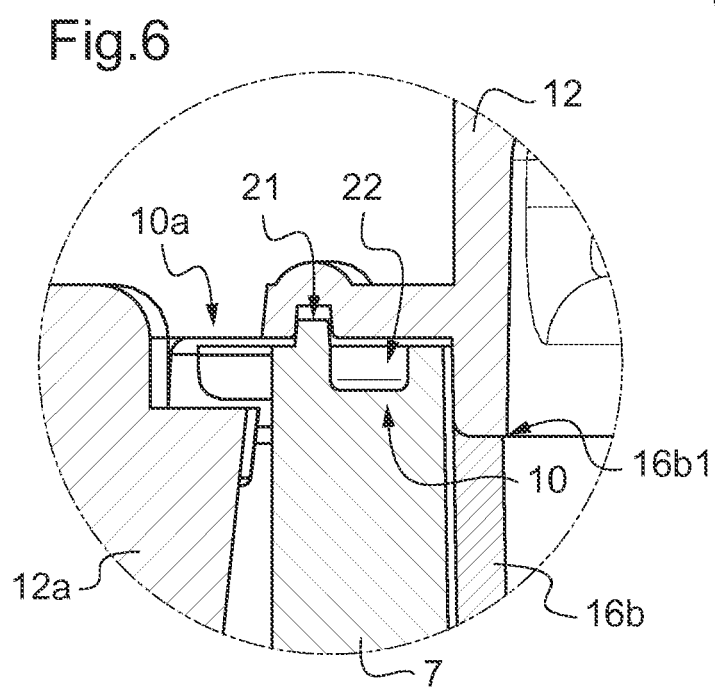
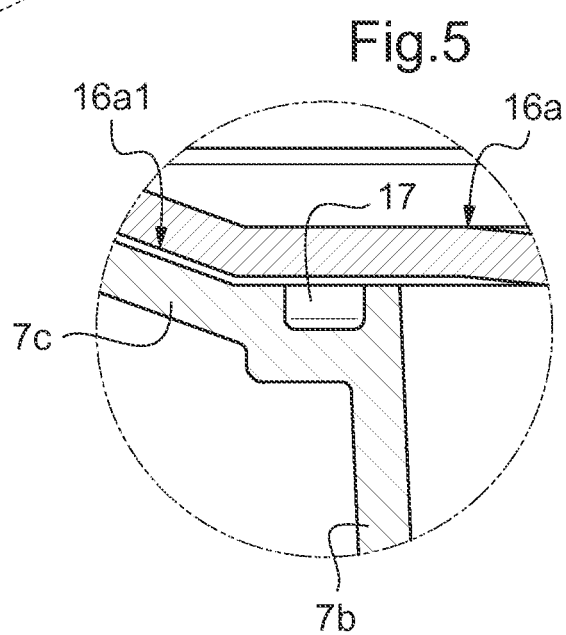
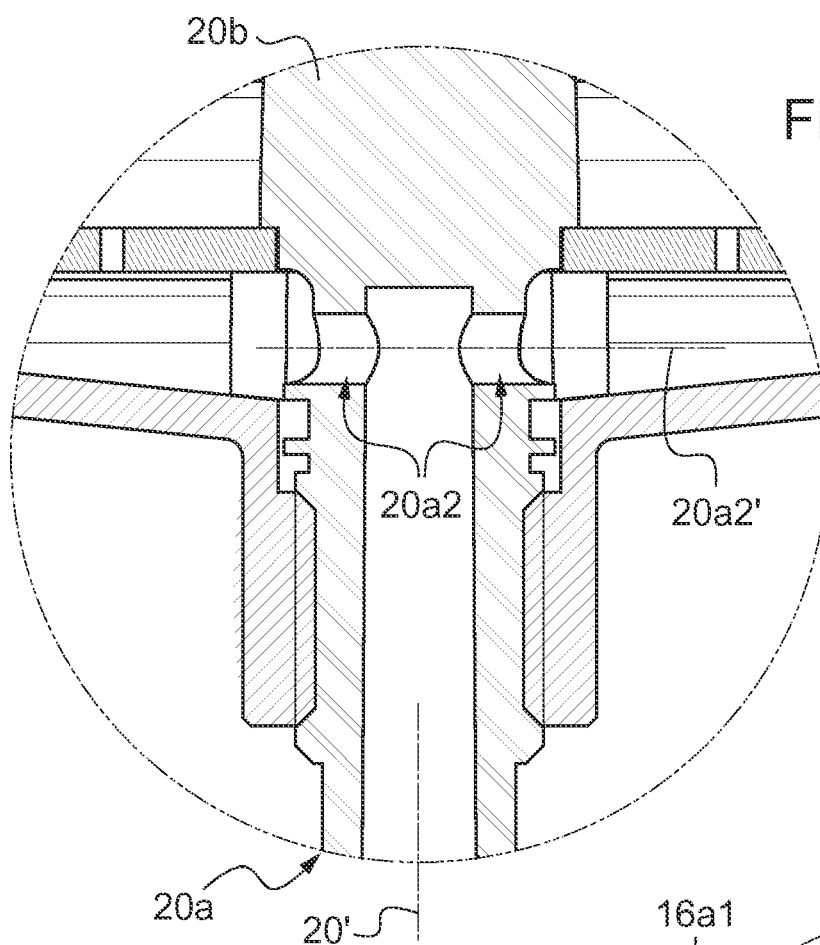


Fig.7

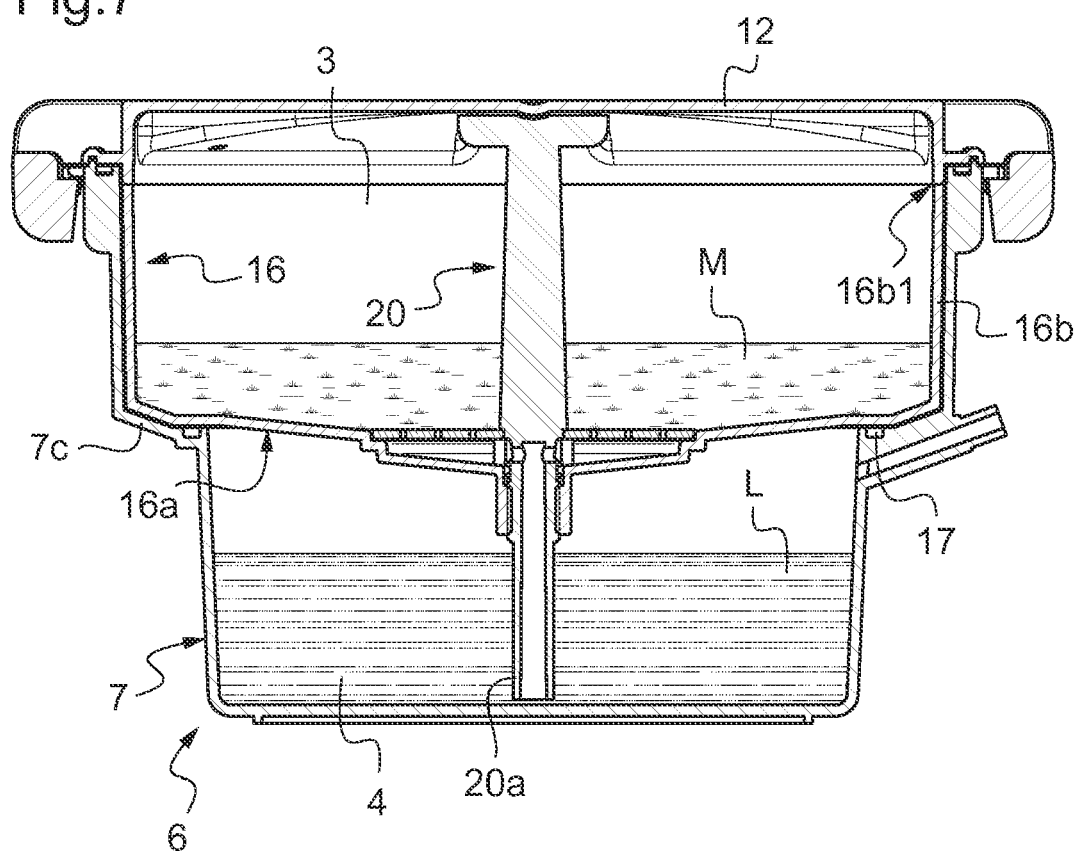
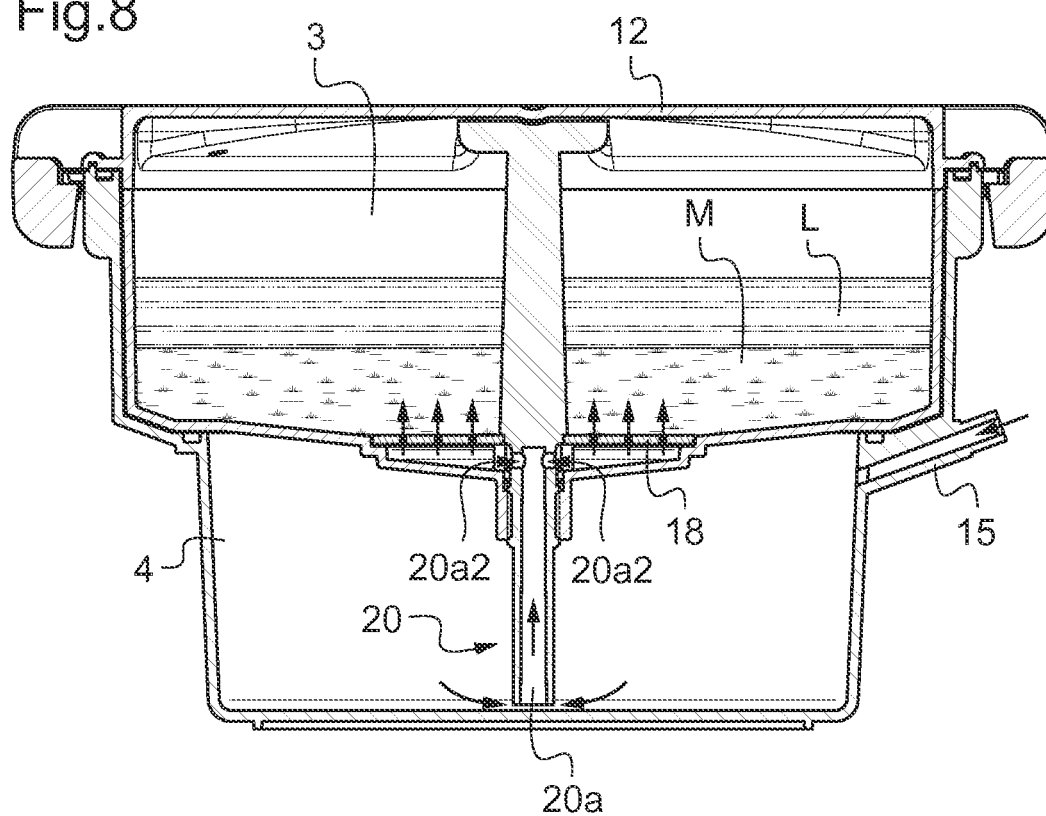


Fig.8



# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

---

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

WO 96/25484 A1 (COOPERATION INTERNATIONALE EN [FR]; TEISSON CLAUDE [FR])  
22 août 1996 (1996-08-22)

**2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL**

US 2008/160615 A1 (HO CHIN-WEN [TW] ET AL)  
3 juillet 2008 (2008-07-03)

TEISSON AND D ALVARD C: "In vitro production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion", 19990901, vol. 42, no. 3-4, 1 septembre 1999 (1999-09-01), pages 499-504, XP009153681, DOI: 10.1007/BF02358166

ESCALONA MARITZA ET AL: "Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets.", novembre 2003 (2003-11), IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY PLANT, VOL. 39, NR. 6, PAGE(S) 651-656, XP002662664, ISSN: 1054-5476

ROBERT MANUEL L ET AL: "A new temporary immersion bioreactor system for micropropagation.", 2006, METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (CLIFTON, N.J.) 2006 LNKD- PUBMED:16673911, VOL. 318, PAGE(S) 121 - 129, XP009153642, ISSN: 1064-3745

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT

N° d'enregistrement national : 1153642

N° de publication : 2974580

<b>3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES</b>